







NOVEL D-AMIDASE AND PRODUCTION OF D-ALPHA-ALANINE AND/OR L-ALPHA-ALANINEAMIDE USING SAME**Publication number:** JP2843596 (B2)**Publication date:** 1999-01-06**Inventor(s):** OZAKI AKIO, ; KAWASAKI HIDENORI, ; HASHIMOTO YUKIO, ; TAMURA KEISHIRO, ; OCHIAI KEIKO, ; KAWAMOTO ISAO**Applicant(s):** KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD, ; KYOWA HATSUKO KOGYO KK**Classification:****- international:** C12P13/02; C12N9/80; C12P13/06; C12P41/00; C12R1/06; C12N9/78; C12P13/00; C12P41/00; (IPC1-7): C12N9/80; C12P13/02; C12P41/00; C12N9/80; C12R1/06; C12P13/02; C12R1/06; C12P41/00; C12R1/06**- European:** C12N9/80; C12P13/06**Application number:** JP19890071367 19890323**Priority number(s):** JP19880070217 19880324**Also published as:** JP1317387 (A)
 EP0334358 (A2)
 EP0334358 (A3)
 EP0334358 (B1)
 US5130240 (A)

more >>

Cited documents: JP63051573 (A)**Abstract of JP 1317387 (A)**

NEW MATERIAL: A novel D-amidase. action and substrate specificity: hydrolyzing D-alpha-alanineamide to form D-alpha-alanine; optimum pH: 7-8 at 30 deg.C; optimum temperature: 40-45 deg.C at pH7.5; thermal stability: if left to stand at >=60 deg.C for 10min, resulting in deactivation; pH stability: stable at pH6.5-10 at 30 deg.C; molecular weight: 50000+ or -5000 (determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis technique); activation: requiring no coenzyme for activation; isoelectric point: pH5.2+ or -0.3. USE: Production of D-alpha-alanine and L-alpha-alanineamide in high optical purity at low cost in high efficiency. PREPARATION: D-amidase-productive bacteria classified as Arthrobacter [e.g., Arthrobacter sp H-4904 (FERM BP 1649)] is put to culture followed by isolation from the resultant culture solution and then purification.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2843596号

(45) 発行日 平成11年(1999) 1 月 6 日

(24) 登録日 平成10年(1998) 10月23日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 N 9/80		C 1 2 N 9/80 Z
C 1 2 P 13/02		C 1 2 P 13/02
41/00		41/00 A
// (C 1 2 N 9/80		
C 1 2 R 1:06)		

請求項の数 4 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平1-71367	(73) 特許権者	999999999 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22) 出願日	平成1年(1989) 3 月23日	(72) 発明者	尾崎 明夫 山口県防府市協和町2-2-104
(65) 公開番号	特開平1-317387	(72) 発明者	川崎 秀紀 山口県防府市協和町1-2
(43) 公開日	平成1年(1989) 12月22日	(72) 発明者	橋本 幸生 山口県防府市協和町2-2-102
審査請求日	平成8年(1996) 1 月31日	(72) 発明者	田村 圭史郎 山口県防府市大字田島1422-66
(31) 優先権主張番号	特願昭63-70217	(72) 発明者	落合 恵子 神奈川県相模原市相武台団地2-2-3-27
(32) 優先日	昭63(1988) 3 月24日	(72) 発明者	川本 勲 神奈川県平塚市ふじみ野1-21-2
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
微生物の受託番号	FERM BP-1649		
微生物の受託番号	FERM BP-1773		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規D-アミダーゼ及びD- α -アラニン及び/又はL- α -アラニンアミドの製造法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記理化学的物質を有する新規D-アミダーゼ

1) 作用および基質特異性: D- α -アラニンアミドに作用してD- α -アラニンアミドを加水分解し、D- α -アラニンを生成する。

2) 至適pH: 30°CでpH7~8に至適pHを有する。

3) 至適温度: pH7.5で40~45°Cに至適温度を有する。

4) 熱安定性: 60°C以上の温度で10分間放置すると失活する。

5) pH安定性: 30°CにおいてpH6.5~10で安定である。

6) 分子量: 50,000 \pm 5,000 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法)

7) 活性化: 活性化に補酵素を必要としない。

8) 等電点: pH5.2 \pm 0.3

2

【請求項2】 請求項1記載のD-アミダーゼの存在下、DL- α -アラニンアミド又はD- α -アラニンアミドを含有する水性媒体中で酵素加水分解を行わせ、反応混合物よりD- α -アラニン及び/又はL- α -アラニンアミドを採取することを特徴とするD- α -アラニン及び/又はL- α -アラニンアミドの製造法。

【請求項3】 請求項1記載のD-アミダーゼ生産能を有する微生物の培養物、菌体または菌体処理物の存在下、DL- α -アラニンアミド又はD- α -アラニンアミドを含有する水性媒体中で酵素加水分解を行わせ、反応混合物よりD- α -アラニン及び/又はL- α -アラニンアミドを採取することを特徴とするD- α -アラニン及び/またはL- α -アラニンアミドの製造法。

【請求項4】 該微生物がアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) H-4904 (FERM BP-1649) また

10

はアースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) H-7095 (FERM BP-1773) である請求項3記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明はD- α -アラニンアミドを特異的に加水分解しD- α -アラニンを生成する新規酵素（以下、D-アミダーゼという）及び該酵素を用いるD- α -アラニン及び／又はL- α -アラニンアミドの製造法に関する。

D- α -アラニンは甘味料または各種生理活性物質合成のための合成中間体あるいは合成原料として用いられる重要な化合物である。また、L- α -アラニンアミドは食品・医薬品として重要なアミノ酸であるL- α -アラニンの製造原料である。

従来の技術

従来、D- α -アラニンを製造する方法としては以下に挙げる方法が知られている。

(1) 微生物を用いてD- α -アラニンを直接発酵生産させる方法（特開昭51-22881,同52-76482）。

(2) DL- α -アラニンにL- α -アラニンのみを分解する能力を持った微生物を作用させ、D- α -アラニンを製造する方法〔大島、田中；アミノアシド・ヌクレイック・アシド (Amino Acid Nucleic Acid) 15 89～93 (1966)〕。

(3) DL- α -アラニンのN-アシル体に微生物の生産するアシラーゼを作用させ、DL- α -アラニンを光学分割することによりD- α -アラニンを製造する方法（特公昭41-22380）。

(4) 5-メチルヒダントインにヒダントイナーゼ活性を有する微生物を作用させ、D-(N-カルバモイル)-アラニンとし、さらに化学的あるいは微生物を用いてD- α -アラニンを製造する方法〔山田ら、発酵と工業 38 937 (1980), 特開昭53-91189,同54-89088,同55-88697,同55-104890,同55-114291等〕。

(5) D- α -アラニンアミドをバチルス属、バクテリジウム属、ミクロコッカス属、プレビバクテリウム属、アクロモバクター属、アルカリゲネス属、クルチア属、シュードモナス属、ロドコッカス属及びゼラチン属に属する微生物が有するD- α -アラニンアミド加水分解活性を用いて加水分解し、D- α -アラニンを製造する方法（特公表56-500319,特開昭60-184392,同61-96989,同61-274690）。

(6) ロドコッカス属に属する微生物が有するD- α -アミノ酸アミドを特異的に加水分解する活性を用いて、DL- α -アミノ酸アミドからD- α -アミノ酸を製造する方法（特開昭63-87998）。

(7) ビルビン酸にD-アミノ酸トランスアミナーゼを作用させ、D- α -アラニンを製造する方法（特開昭62-205790）。

(8) DL- α -アラニンのp-クロルベンゼンスルホ

ン酸塩の優先晶出法による化学的な光学分割法によりD- α -アラニンを製造する方法（特公昭47-14369,特開昭48-57914）。

上記D- α -アラニンを製造する方法において、(1), (2), (6), (8)の方法はD- α -アラニンの生産性がないかあるいは低い。(3), (4), (7)の方法は反応が数段階になり操作が煩雑である。又、(5), (7)の方法は光学活性な基質を用いる必要があり、基質が高価であるため製造コストが高い。

D- α -アラニンアミドを加水分解する酵素は、日本農芸化学会昭和63年度大会講演要旨集352頁に開示されている。

また、工業的に安価でかつ光学純度の高いL- α -アラニンアミドの製造方法は知られていない。

発明が解決しようとする課題

現在安価なDL- α -アラニンアミドに作用して、直接光学純度の高いD- α -アラニン及びL- α -アラニンアミドを生産する酵素及び該酵素を用いるD- α -アラニン及びL- α -アラニンアミドの製造法が求められている。

課題を解決するための手段

DL- α -アラニンアミドからD- α -アラニンを工業的に有利に製造する方法の開発を目的に検討を行った。その結果、アースロバクター属に属する微生物がD- α -アラニンアミドを特異的に加水分解しDL- α -アラニンアミド又はD- α -アラニンアミドよりD- α -アラニンを生成する酵素を生産することを見出した。該酵素を単離、精製し、その理化学的性質を調べたところ新規な酵素であることが判明し、本発明を完成した。

本発明は新規D- α -アミダーゼ及びアースロバクター属に属し、D-アミダーゼ生産能を有する微生物の培養物、菌体、菌体処理物または菌体より単離、精製したD-アミダーゼの存在下、DL- α -アラニンアミド又はD- α -アラニンアミドを含有する水性媒体中で酵素加水分解反応を行わせ、反応混合物よりD- α -アラニン及び／又はL- α -アラニンアミドの製造法を提供する。

本発明におけるD-アミダーゼは下記の理化学的性質を有する。

1) 作用および基質特異性: D- α -アラニンアミドに作用してD- α -アラニンアミドを加水分解し、D- α -アラニンを生成する。

D- α -アラニンアミドに対するKm値は約4mMであり、L- α -アラニンアミドに対するKm値は約26mMである。

L- α -アラニンアミド加水分解活性はD- α -アラニンアミド加水分解活性の0～1.5%である。

2) 至適pH: 30℃でpH7～8に至適pHを有する。

3) 至適温度: pH7.5で40～45℃に至適温度を有する。

4) 熱安定性: 60℃以上の温度で10分間放置すると失活

する。

- 5) pH安定性:30℃においてpH6.5~10で安定である。
- 6) 分子量:50,000±5,000 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による)
- 7) 活性化:活性化に補酵素を必要としない。
- 8) 等電点:pH5.2±0.3

本発明で用いる微生物としては、アースロバクター属に属し、上記性質を有する酵素を生産する能力を有する微生物であればいずれでもよいが、例えば、アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) H-4904を例示することができる。

アースロバクター・エスピー H-4904は、自然界より新たに分離された微生物である。

アースロバクター・エスピー H-4904の菌学的性質を以下に述べる。

(a) 形態

- 1) 細胞の形および大きさ:球状(直径0.8~1.0μm)と桿状(直径0.8μm,長さ1.2~1.5μm)の形態をとる。
- 2) 運動性:極ペンを有し運動性がある。
- 3) 孢子:形成しない。
- 4) グラム染色性:陽性
- 5) 抗酸性:ほとんど認められない。

(b) 各培地における生育状態

- 1) 肉汁寒天平板培養:円形、凸円状のなめらかな集落を形成する。不透明白黄色を呈す。抗散性色素は生成しない。
- 2) 肉汁寒天斜面培養:十分に生育し、不透明白黄色を呈す。
- 3) 肉汁液体培養:混濁状に生育し、表面に膜を形成しない。
- 4) 肉汁ゼラチン穿刺培養:液化しない。
- 5) リトマス・ミルク・リトマスを還元せず、凝固もみられない。

(c) 生理学的性質

- 1) 硝酸塩の還元:陽性
- 2) 脱窒反応:陽性
- 3) MRテスト:陰性
- 4) VPテスト:陰性
- 5) インドールの生成:陰性
- 6) 硫化水素の生成:陰性
- 7) デンブンの加水分解:陰性
- 8) ケエン酸の利用(シモンズの培地):陽性
- 9) 無機窒素源の利用
 - 硝酸塩:陰性
 - アンモニウム塩:弱陽性
- 10) 色素の生成:陰性
- 11) ウレアーゼ:陰性
- 12) オキシダーゼ:陰性
- 13) カタラーゼ:陽性

14) 生育の範囲

- 1) pH:pH5.0~9.0(至適6.0~8.0)
- 2) 温度:15~37℃(至適30℃)

15) 酸素に対する態度:好気性ないし通性嫌気性

16) OFテスト:陰性

17) 糖類からの酸、ガスの生成:

酸 ガス(ペプトン水)

L-アラビノース	—	—
D-キシロース	—	—
D-グルコース	—	—
D-マンノース	—	—
D-フラクトース	—	—
D-ガラクトース	—	—
麦芽糖	—	—
ショ糖	—	—
乳糖	—	—
トレハロース	—	—
D-ソルビット	—	—
D-マンニット	—	—
イノシット	—	—
グリセリン	—	—
デンプン	—	—

18) 塩化ナトリウム耐性:15%NaClで生育する。

(d) 化学的組成

- 1) ペプチドグリカン構成アミノ酸:リジン, アラニン, グルタミン酸

- 2) mol%G+C(Tm):63.17

以上の菌学的性質を有する菌について、バージェイのマニュアル(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) vol.2(1986年)の記載と照合し、グラム陽性で球状または桿状の形態をとり、極ペンを有し運動性があり、好気性ないし通性嫌気性であり、孢子を形成せず、ペプチドグリカン構成アミノ酸としてリジン, アラニン, グルタミン酸を有し、DNAのmol%G+Cが63.17であることに基づいて検索した結果、本菌株はアースロバクター(Arthrobacter)属に属する細菌と同定し、本菌株をアースロバクター・エスピー(Arthrobacter sp.) H-4904と命名した。

本菌株は昭和63年1月14日付で工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-1649として寄託されている。

これらの微生物を培養する培地は、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、本発明の酵素を生成する能力を有する微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでも良い。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであれば良く、グルコース、シュクロース、これらを含有する糖蜜、デンプン加水分解物などの炭水化物、酢酸、プロピオン酸などの有機酸、およびエタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫

酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、アミン類、その他含窒素化合物ならびにペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物などが用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどが用いられる。

培養は振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15〜37°Cが良く、培養時間は通常16〜72時間である。

培養中pHは5.0〜9.0に保持する。pHの調整は無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

培養の際、D- α -アラニンアミド、L- α -アラニンアミドあるいはDL- α -アラニンアミドを0.1g/ℓ〜20g/ℓ培地に添加し、菌体中にD-アミダーゼを誘導蓄積させる必要があるが、適当な変異株を用いることにより、培地にD- α -アラニンアミド、L- α -アラニンアミドあるいはDL- α -アラニンアミド（以下、誘導物質と言う）を添加することなく、D-アミダーゼを蓄積させることができる。

このような変異株はアースロバクター・エスピー H-4904を親株として通常の変異誘導法、例えば紫外線照射、X線照射、放射線照射、変異誘起剤処理などにより得ることができる。

目的とする変異株は、変異処理後、通常の栄養培地、例えばブイヨン・酵母エキス培地に生じたコロニーを取得し、誘導物質を添加しない培地中でD-アミダーゼを蓄積する菌株を選択することにより得ることができる。

このようにして取得した変異株の例としては、アースロバクター・エスピー H-7095があげられる。アースロバクター・エスピー H-7095は、昭和63年3月2日付で工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-1773として寄託されている。

培養液から酵素を単離、精製するには、通常の酸素の単離、精製法を用いればよい。例えば培養液を遠心分離して集菌し、超音波破碎、フレンチプレス、マントンガウリン、ダイノミルなどによる機械的破碎により菌体を破碎後、得られる破碎液を遠心分離し、その上清の硫酸などによる塩析、DEAE-セファロース、CM-セファロースなどのイオン交換クロマトグラフィー等を行い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に単一の酵素を得ることができる。

酵素活性の測定法は、以下の通りである。

250mM D- α -アラニンアミドを含む50mM リン酸緩衝液（pH7.5）1.0mlを30°Cで5分間加温した後、酵素溶液0.1mlを加えて30°C、30分間反応させる。0.1mlの6N

塩酸を加えて反応を停止させ、生成したD- α -アラニン量を下記条件下で高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定する。

カラム：CHIRALPAK WE（-）ダイセル化学工業社製

溶出液：0.25mM CuSO₄水溶液

流速：1ml/分

カラム温度：45°C

検出法：o-フタルアルデヒドを加えて、50°Cで反応させ、蛍光を検出（励起波長：344nm、蛍光波長：444nm）

10 酵素活性は上記測定条件下、1分間に1 μ molのD- α -アラニンを生成させる活性を1単位（U）として表示する。

L- α -アラニンアミドを加水分解し、L- α -アラニンを生成する活性（以下、L-アミダーゼ活性という）は、上記測定条件下、D- α -アラニンアミドの代わりにL- α -アラニンアミドを用いることにより測定することができる。

20 DL- α -アラニンアミド又はD- α -アラニンアミドに本発明の酵素を作用させることにより、D- α -アラニン及び／又はL- α -アラニンアミドを生成させることができるが、本発明の酵素を生産する能力を有する微生物の培養物、菌体あるいは菌体処理物の存在下、DL- α -アラニンアミド又はD- α -アラニンアミドを含有する水性媒体中で酵素加水分解反応を行わせ、反応混合物よりD- α -アラニン及び／又はL- α -アラニンアミドを採取することが好ましい。

反応は、微生物の培養中でもよく、培養後、培養物、菌体、菌体処理物または精製酵素とDL- α -アラニンアミドまたはD- α -アラニンアミドとを水性媒体中で反応させてもよい。

30 D-アミダーゼ活性を有する微生物の菌体処理物としては、菌体の乾燥物、凍結乾燥物、界面活性剤処理物、酵素処理物、超音波処理物、機械的摩砕処理物、溶媒処理物、菌体の蛋白質分画、菌体および菌体処理物の固定化物などがあげられる。

精製したD-アミダーゼはそのまま用いてもよいが、固定化物として用いることもできる。

水性媒体としては水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノール、プロパノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などがあげられる。

反応に精製した酵素を用いる場合は、酵素の安定化を向上させるために該水性媒体に5〜50%のグリセロールを添加することが好ましい。

反応は通常、温度15°C〜50°CでpH6.0〜9.5で1〜48時間行う。反応液中の酵素量は、用いるDL- α -アラニンアミドまたはD- α -アラニンアミドの量及び反応時間により適宜決定すれば良いが、通常は1〜300K単位/ℓである。特に反応に菌体を用いる場合は通常湿菌体で1g

/ℓ～50q/ℓである。反応に用いるDL-α-アラニンアミドおよびD-α-アラニンアミドは、遊離型、塩酸塩、硫酸塩のいずれでも良く、DL-α-アラニンアミドの場合は、1～500q/ℓ、好ましくは1～400q/ℓが用いられる。D-α-アラニンアミドの場合は、1～300q/ℓ、好ましくは1～200q/ℓが用いられる。

また、一般的に微生物菌体中に含まれるアラニンラセマーゼは、光学活性なアラニンのラセミ化を触媒する酵素であり、上記反応で生成するD-α-アラニンの光学純度を低下させる。本発明で用いる微生物はアラニンラセマーゼ含有量が低く、当該微生物をそのまま用いても十分な光学純度のD-α-アラニンを得ることができるが、アラニンラセマーゼ活性を抑制する公知の方法、例えば、通常の変異処理によりアラニンラセマーゼ活性がないかあるいは活性が低下した変異株を取得し反応に用いる〔ジェイ・ワイルド (J.Wild) 他；モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Mol.Gen.Genet.) 198,315-332 (1985)〕、熱処理などによりアラニンラセマーゼ活性を失活させる〔高松、土佐、千畑；日本化学会誌 9,1369 (1983)〕あるいはアラニンラセマーゼ阻害剤を反応時添加する〔化学と生物 20,770-772 (1986)；生化学実験講座 11,275-296〕などの方法を適宜用いることにより、さらに光学純度の高いD-α-アラニンを得ることができる。

反応にDL-α-アラニンアミドを用いる場合、D-α-アラニンが水性媒体中に生成蓄積すると共に、反応後、L-α-アラニンアミドが反応液中に残存するので、これを該水性媒体中より採取することによりL-α-アラニンアミドを製造することができる。

培養液または水性媒体中からD-α-アラニンおよびL-α-アラニンアミドを回収する方法としては、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィーあるいは晶出法など通常の分離方法が用いられる。

以下、実施例により本発明を説明する。

実施例1.

BYC培地〔粉末ブイヨン（極東社製）2%，酵母エキス（Difco社製）0.5%，ポリペプトン0.5%，グルコース0.2%を含み、6N NaOHでpH7.2に調整した培地〕を2ℓのバフフル付フラスコに150mlずつ分注し、120℃、20分間殺菌した。この培地にブイヨンスラントに生育したアースロバクター・エスピー H-4904を一白金耳植菌し、30℃、20時間振盪培養し、種培養液として用いた。

一方、グルコース3%，コーン・スチープ・リカー2%，ペプトン0.5%，NaCl 1%，(NH₄)₂SO₄ 2%，MgSO₄・7H₂O 0.3%，FeSO₄・7H₂O 0.001%，MnSO₄・7H₂O 0.0001%，DL-α-アラニンアミド0.6%を含有するpH7.2の培地を調製し、30ℓ容量のジャーファーメンターに18ℓ分注し、120℃、20分間殺菌した。この培地に、種培養液2ℓを無菌的に接種し、30℃、450rpm、通気量10ℓ/分にて30時間培養した。得られた培養液のD-アミダーゼ活性

は64単位/mlであった。

培養液を遠心分離し得た菌体を50mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）1.9ℓに懸濁した後、ダイノミル（DYNO-MILL；ラボラトリーミルKDL型、W.A.Bachafen Maschinenfabrik社製）により菌体破碎を行った。菌体破碎液を遠心分離して得られた上清を50mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）にて平衡化したDEAE-セファロースファーストフロー（ファルマシア社製）カラムクロマトグラフィーに供し、0～0.4M塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて濃度勾配溶出を行った。0.2M塩化ナトリウム溶出画分にD-アミダーゼが溶出された。活性画分をさらに20%飽和濃度の硫酸を含む50mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）で平衡化したブチルトヨバル（TSK-GEL 650C 東洋曹達社製）カラムクロマトグラフィーに供し、20%～0.1%飽和硫酸を含む同緩衝液を用いて濃度勾配溶出を行った。

15%～10%飽和硫酸溶出画分にD-アミダーゼが溶出された。活性画分をUF膜（SIP-1013、旭化成社製）にて脱塩後、グリセロールを25%（v/v）になるように添加し、グリセロール25%（v/v）を含む50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）にて平衡化したDEAE-Trisacryl LS（Réactifs IBF Soc.Chim社製）カラムクロマトグラフィーに供し、0～0.4Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて濃度勾配溶出を行った。D-アミダーゼは、0.2M塩化ナトリウムを含む画分に溶出された。

得られた酵素のD-アミダーゼ活性は6.0×10⁴単位であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約50,000の単一のバンドを示した。

本酵素のD-α-アラニンアミドおよびL-α-アラニンアミドに対する比活性及びKm値を第1表に示した。

第 1 表

	D-α-アラ ニンアミド	L-α-アラ ニンアミド
比活性(単位/mg蛋白質)	1800	17.4
Km(mM)	4.2	26.1

第1図にpHを変化させた場合の活性をpH7.5での酵素活性を100とした相対活性で示した。第1図に示したように、本酵素は30℃でpH7～8に至適pHを有していた。第2図に温度を変化させた場合の活性を37℃での酵素活性を100とした相対活性で示した。第2図に示したように、本酵素はpH7.5で40～45℃に至適温度を有していた。

本酵素のpH安定性を以下の方法により測定した。

本酵素を19.2単位含む50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）0.05mlを25%グリセロールを含むpH6～10の各種緩衝液0.95mlに加え、30℃で2時間放置した。静置後、この酵素溶液0.05mlを、0.5mlのD-α-アラニンアミド溶液〔D-α-アラニンアミド12.5q/ℓ、グリセロール25%（v/v）を含む50mMリン酸緩衝液（pH7.5）〕に加え37

11

℃で30分間反応を行った。反応後、6N塩酸0.1mlを加えて反応を停止させた後、生成したD-α-アラニン量を定量した。酵素活性は、30℃、2時間静置前の酵素活性を100とした相対活性で表示した。結果を第3図に示した。第3図に示したように、本酵素はpH6.5~10の範囲で安定であった。

本酵素の温度安定性を以下の方法により測定した。

本酵素を192単位含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5) 0.5mlを25% (v/v) グリセロールを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5) で10倍に希釈した。この希釈溶液0.5ml 10をとり、各種の温度で10分間静置した後、直ちに氷冷した。静置後、この酵素溶液0.05mlを0.5mlのD-α-アラニンアミド溶液〔D-α-アラニンアミド12.5g/ℓ、グリセロール25% (v/v) を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5) 〕に加え37℃で30分間反応を行った。反応後、6N塩酸0.1mlを加えて反応を停止させた後、生成したD-α-アラニン量を定量した。酵素活性は、各温度で10分間放置する前の酵素活性を100とした相対活性で表示した。結果を第4図に示した。第4図に示したように、本酵素は60℃以上の温度で10分間放置すると失活した。 20

実施例2.

実施例1と同一組成のBYG培地を2ℓのバッフル付フラスコに150mlずつ分注し、120℃、20分間殺菌した。この培地に、ブイヨンスラントに生育したアースロバクター・エスピー H-4904を一白金耳植菌し、30℃、20時間振盪培養し、種培養液として用いた。

一方、グルコース3%, コーン・スチープ・リカー2%, ペプトン0.5%, NaCl 1%, (NH₄)₂SO₄ 2%, MgSO₄・7H₂O 0.3%, FeSO₄・7H₂O 0.0001%, MnSO₄・7H₂O 0.0001%, DL-α-アラニンアミド0.6%を含有するpH7.2の培地を調製し、3ℓ容量のジャーファーメンターに1.5ℓ分注し、120℃、20分間殺菌した。この培地に、種培養液150mlを無菌的に接種し、30℃、800rpm、通気量1v/vmにて24時間培養した。得られた培養液を4℃で5000rpm、10分間遠心分離した。得られた湿菌体10gに、DL-α-アラニンアミド420g (塩酸塩として592g)、NaH₂PO₄・2H₂O 15.6g、Na₂HPO₄・12H₂O 35.8gを脱イオン水に溶解した溶液を加え、全量で2ℓとした。10N NaOHにてpH6.7に調整した後、反応混合液をゆるやかに攪拌しながら 38℃、10時間反応を行った。反応中は、6N HClにてpH6.7に維持した。 40

反応終了後、反応混合液中のD-α-アラニン量及びL-α-アラニンアミド量を定量した。その結果を第2表に示した。

第 2 表

	力価 (g/ℓ)	反応収 率(%)	光学純度 (%)
D-α-アラニン	105	99	99.3
L-α-アラニンアミド	105	—	99.0

この反応混合液を1ℓ取り、pHを4.5に調整した後、イオン交換樹脂ダイヤイオンSK1B (NH₄⁺型) (三菱化成社製) 3ℓに通塔し、D-α-アラニンおよびL-α-アラニンアミドを分離した。D-α-アラニン、L-α-アラニンアミドそれぞれを含む画分を減圧濃縮し、結晶を析出させた結果、D-α-アラニン85g (光学純度99.5%以上)、L-α-アラニンアミド75g (光学純度99.5%以上)を得た。

実施例3.

DL-α-アラニンアミドの代りに、D-α-アラニンアミド210gを用いた以外は実施例2と同様に行った。

その結果、反応終了時、D-α-アラニンが103g/ℓ (光学純度99.1%) 生成蓄積した。

実施例4.

アースロバクター・エスピー H-4904を親株として、変異株の分離を行った。親株をNB培地〔粉末ブイヨン(極東社製) 20gおよび酵母エキス(Difco社製) 5gを水1ℓに含みNaOHでpH7.2に調整した培地〕で30℃、1日間培養した。菌体を集菌し、0.1Nトリス-マレイン酸緩衝液(pH6.0)に、10⁸細胞/mlの濃度に懸濁し、ここにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)を400μg/mlになるように添加し、室温で30分間処理した。生理食塩水にて菌体を充分洗浄したのち、NB寒天培地(NB培地に寒天20gを加えた培地)に塗布し、30℃で1~6日間培養した。出現したコロニーをNB寒天培地に一担塗布し、30℃で1~2日間培養した。

このようにして取得した菌株を、120℃、20分間殺菌したBYG培地40mlを含有する250ml容量の三角フラスコに一白金耳植菌し、30℃で21時間振盪培養した。得られた培養液を5000rpm、10分間遠心分離し菌体を得た。得られた菌体は湿菌体として2g/ℓの濃度になるように、D-α-アラニンアミド塩酸塩を含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁した。D-α-アラニンアミド塩酸塩濃度は終濃度で、D-α-アラニンアミドとして25g/ℓになるように調整した。38℃にて1時間反応後、実施例1の条件に従い高速液体クロマトグラフィーにて、生成したD-α-アラニン量を定量し、湿菌体当りのD-アミダーゼ活性を算出した。

D-アミダーゼ活性は湿菌体1g当りの単位数で表示した。対照として、アースロバクター・エスピー H-4904を用い、培地中にDL-α-アラニンアミドを2g/ℓ添加した以外は上記と同様に行いD-アミダーゼ活性を測定した。

50 このようにして、誘導物質を添加して培養した親株と

誘導物質無添加培地にてはば同じD-アミダーゼ活性を蓄積する変異株として、アースロバクター・エスピー H-7095を取得した。

結果を第3表に示す。

第 3 表

菌株	DL- α -アラニン アミド添加の有無	D-アミダーゼ活性 単位/g湿菌体
アースロバク ター・エスピ ーH-4904	有	666
アースロバク ター・エスピ ーH-7095	無	633

実施例5.

アースロバクター・エスピー H-7095を用い、培地にDL- α -アラニンアミドを添加せずに培養を行う以外は、実施例2と同様に行った。

結果を第4表に示す。

第 4 表

	力価 (g/ℓ)	反応収 率(%)	光学純度 (%)
D- α -アラニン	104	99	99.2
L- α -アラニンアミド	105	—	99.0

実施例6.

DL- α -アラニンアミドの代わりにD- α -アラニンアミド210gを用いる以外は実施例5と同様に行った。

その結果、反応終了時、D- α -アラニンが104g/ℓ（光学純度99.3%）生成蓄積した。

実施例7.

アースロバクター・エスピー H-7095を用い、実施例5と同様に培養を行って得られた湿菌体90gを生理食塩水で洗浄し、遠心分離した後、蒸留水に全量で150mlとなるように懸濁した。この懸濁液に、アルギン酸ナトリウム（富士化学工業社製）9gを蒸留水300mlに溶解した溶液を加え、得られた混合液を2%塩化カルシウム溶

液に滴下することにより、粒径約2mmの固定化菌体を得た。固定化菌体25g/ℓを用いて、実施例2と同様に反応を行った結果、D- α -アラニンが105g/ℓ（光学純度98.2%）生成蓄積した。

実施例8.

アースロバクター・エスピー H-7095を用い、実施例5と同様に培養を行って得られた湿菌体50gを10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に全量で200mlとなるように懸濁した。この懸濁液をホモゲナイザー（ニッセイ・エクセル

- 10 オートホモゲナイザー）で氷冷下、15000rpm、20分間処理し、菌体を破碎した。得られた菌体破碎液を4℃で12000rpm、20分間遠心分離し、上清を菌体抽出液として得た。上清100mlは、あらかじめ10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したHPA-75（三菱化成社製）20mlに5℃、24時間接触させた。このHPA-75を更に0.5%グルタルアルデヒド溶液に懸濁し、4℃で120分間反応させ、D-アミダーゼとHPA-75を架橋させた後、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で3回洗浄し、D-アミダーゼの固定化物を得た。この固定化物の比活性は、550単位/mlであった。この固定化物20ml/ℓを用いて、実施例2と同様に反応を行った結果、D- α -アラニンが104g/ℓ（光学純度99.2%）生成蓄積した。

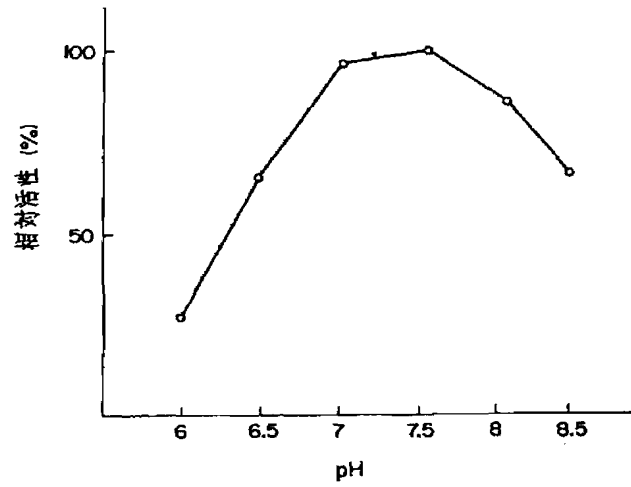
発明の効果

本発明により、新規なD-アミダーゼが得られ、甘味料または各種生理活性物質合成のための中間体あるいは合成原料として有用な光学純度の高いD- α -アラニン及び／又は食品・医薬品として重要なアミノ酸であるL- α -アラニンの製造原料であるL- α -アラニンアミドを安価にかつ効率よく製造することができる。

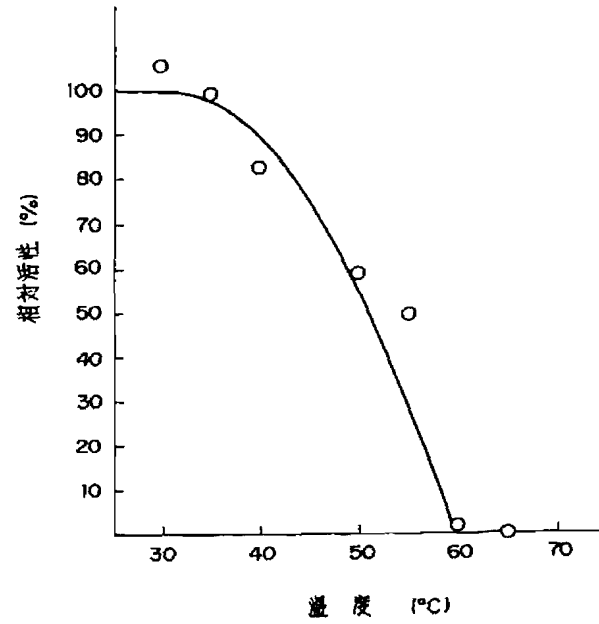
30 【図面の簡単な説明】

第1図は本酵素のpH依存性、第2図は本酵素の温度依存性、第3図は本酵素のpH安定性、第4図は本酵素の温度安定性をそれぞれ示す。

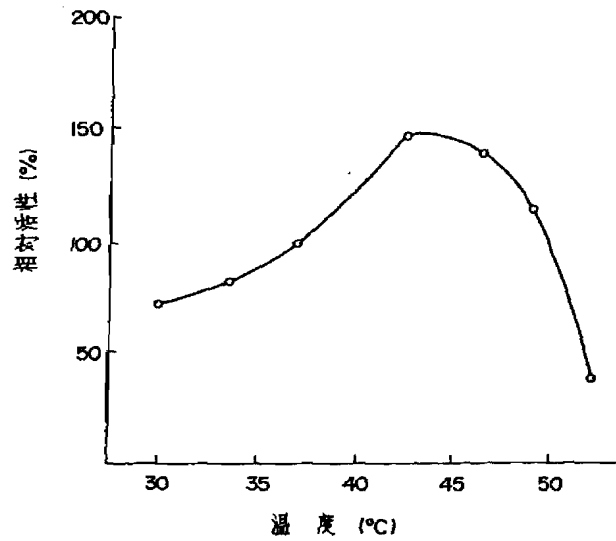
【第1図】



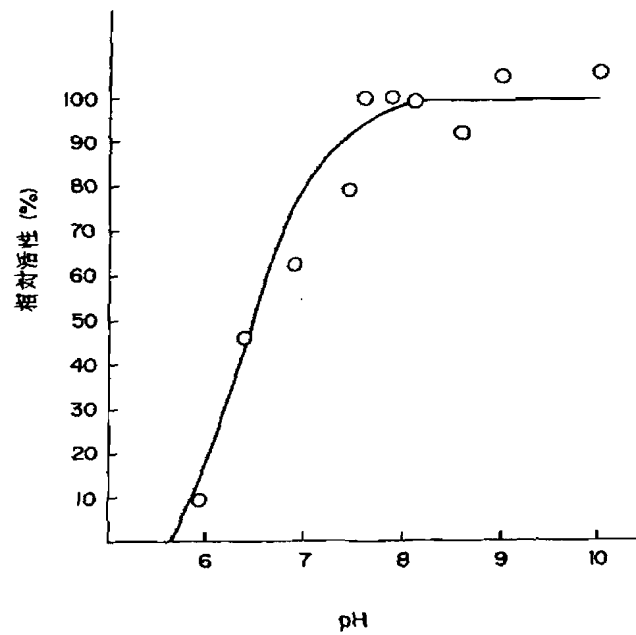
【第4図】



【第2図】



【第3図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

(C 1 2 P 13/02

C 1 2 R 1:06)

(C 1 2 P 41/00

C 1 2 R 1:06)

審査官 富永 みどり

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

(56)参考文献 特開 平1-225482 (J P, A)

特開 昭61-96989 (J P, A)

特開 昭61-119199 (J P, A)

特開 昭49-41591 (J P, A)

特開 昭61-187788 (J P, A)

C12H 9/00 -9/99

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

EPAT (QUESTEL)

* NOTICES *

JPO and IPJIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] New D-amidase 1 operation and substrate specificity which have the following physicochemical substance: Act on D-alpha-alaninamide, hydrolyze D-alpha-alaninamide and generate D-alpha-aminopropionic acid.

- 2) Optimal pH : it has [pH seven to 8] optimal pH at 30 **.
- 3) Optimum temperature : it has optimum temperature at 40-45 ** by pH7.5.
- 4) Thermal stability : it will be deactivated if it is neglected for 10 minutes at temperature of not less than 60 **.
- 5) pH stability : in 30 **, it is stable at pH 6.5-10.
- 6) A molecular weight : 50,000**5,000 (SDS-polyacrylamide electrophoresis method)
- 7) Activation : don't need a coenzyme for activation.
- 8) an isoelectric point: pH5.2**0.3[Claim 2] Enzymatic hydrolysis is made to perform in an aqueous medium containing DL-alpha-alaninamide or D-alpha-alaninamide under existence of the D-amidase according to claim 1. A manufacturing method of D-alpha-aminopropionic acid extracting D-alpha-aminopropionic acid and/or L-alpha-alaninamide from a reaction mixture, and/or L-alpha-alaninamide.
- [Claim 3] Under existence of a culture of a microorganism which has the D-amidase productivity according to claim 1, a biomass, or a biomass treatment object, A manufacturing method of D-alpha-aminopropionic acid making enzymatic hydrolysis perform in an aqueous medium containing DL-alpha-alaninamide or D-alpha-alaninamide, and extracting D-alpha-aminopropionic acid and/or L-alpha-alaninamide from a reaction mixture, and/or L-alpha-alaninamide.
- [Claim 4] The manufacturing method according to claim 3 in which this microorganism is *Arthrobacter Espy* (*Arthrobacter* sp.) H-4904 (FERM BP-1649) or *Arthrobacter Espy* (*Arthrobacter* sp.) H-7095 (FERM BP-1773).

[Translation done.]

* NOTICES *

JP0 and IMPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Field of the Invention This invention relates to the manufacturing method of D-alpha-aminopropionic acid and/or L-alpha-alaninamide using the new enzyme (henceforth D-amidase) which hydrolyzes D-alpha-alaninamide specifically and generates D-alpha-aminopropionic acid, and this enzyme.

D-alpha-aminopropionic acid is an important compound used as the synthetic intermediate or synthetic powder for sweeteners or various physiological active substance composition. L-alpha-alaninamide is manufacturing raw materials of L-alpha-aminopropionic acid which is amino acid important as foodstuffs and drugs.

Prior art The method of listing to below as a method of manufacturing D-alpha-aminopropionic acid is known conventionally.

- (1) The method of carrying out production by fermentation of the D-alpha-aminopropionic acid directly using a microorganism (JP 51-22881A, said 52-76482).
 - (2) How to make a microorganism with the capability to decompose only L-alpha-aminopropionic acid into DL-alpha-aminopropionic acid act, and to manufacture D-alpha-aminopropionic acid [Oshima, Tanaka; amino acid NUKUREKKU acid (Amino Acid Nucleic Acid) 1589-93 (1966)] .
 - (3) How (JP,41-22380B) to manufacture D-alpha-aminopropionic acid by making the acylase which a microorganism produces act on N-acyl object of DL-alpha-aminopropionic acid, and carrying out optical resolution of the DL-alpha-aminopropionic acid.
 - (4) Make the microorganism which has HIDANTOINAZE activity act on 5-methylhydantoin, and it is D-(N-carbamoyl)- How to consider it as an alanine and to manufacture D-alpha-aminopropionic acid using a microorganism still more chemically [Yamada et al., fermentation and the industry 38937 (1980), JP,53-91189A, said 54-89088, said 55-88697, said 55-104990, the 55-114291 grade] .
 - (5) D-alpha-alaninamide. Bacillus and a tapir -- using the D-alpha-alaninamide hydrolyzing activity which the microorganism belonging to a TERIJUMU group, the Micrococcus, Brevibacterium, Achromobacter, Alcaligenes, Kurthia, Pseudomonas, a Rhodococcus group, and a gelatin group has, [hydrolyze and] How (the Patent Publication table 56-500319, JP,60-184392A, said 61-96989, said 61-274690) to manufacture D-alpha-aminopropionic acid.
 - (6) How (JP,63-87998A) to manufacture D-alpha-amino acid from DL-alpha-amino acid amide using the activity which hydrolyzes specifically the D-alpha-amino acid amide which the microorganism belonging to a Rhodococcus group has.
 - (7) How (JP,62-205790A) to make D-amino acid transaminase act on pyruvic acid, and to manufacture D-alpha-aminopropionic acid.
 - (8) How (JP,47-14369B, JP,48-57914A) to manufacture D-alpha-aminopropionic acid by the chemical optical-resolution method by the priority crystallizing method of p-chlorobenzene sulfonate of DL-alpha-aminopropionic acid.
- or [that the method of (1), (2), (6), and (8) does not have the productivity of D-alpha-aminopropionic acid in the method of manufacturing the above-mentioned D-alpha-aminopropionic acid] -- or it is low. A reaction will be several steps and the method of (3), (4), and (7) has complicated operation. The method of (5) and (7) needs to use an optical activity substrate, and since the substrate is expensive, its manufacturing cost is high.
- The enzyme which hydrolyzes D-alpha-alaninamide is indicated by collection of convention lecture guests in Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Showa 63 fiscal year 352 page.

The manufacturing method of cheap L-alpha-alaninamide with high optical purity is not known industrially.

Object of the Invention It acts on cheap DL-alpha-alaninamide now and the manufacturing method of D-alpha-aminopropionic acid and L-alpha-alaninamide using the enzyme which produces D-alpha-aminopropionic acid with directly high optical purity and L-alpha-alaninamide, and this enzyme is called for.

The means for solving a technical problem It inquired for the purpose of development of the method of manufacturing D-alpha-aminopropionic acid advantageously industrially from DL-alpha-alaninamide. As a result, the microorganism belonging to the Arthrobacter group found out producing the enzyme which hydrolyzes D-alpha-alaninamide specifically and generates D-alpha-aminopropionic acid from DL-alpha-alaninamide or D-alpha-alaninamide. It isolated and this enzyme was refined, when the physicochemical property was investigated, it became clear that it was a new enzyme, and this invention was completed.

The culture of the microorganism which this invention belongs to a new D-alpha-amidase and the Arthrobacter group, and has D-amidase productivity. An enzymatic hydrolysis reaction is made to perform in the aqueous medium containing DL-alpha-alaninamide or D-alpha-alaninamide under existence of D-amidase isolated and refined from the biomass, the biomass treatment object, or the biomass, and the manufacturing method of D-alpha-aminopropionic acid and/or L-alpha-alaninamide is provided from a reaction mixture.

D-amidase in this invention has the following physicochemical property.

- 1) An operation and substrate specificity : act on D-alpha-alaninamide, hydrolyze D-alpha-alaninamide and generate D-alpha-aminopropionic acid.

Km values to D-alpha-alaninamide are about 4 mM(s), and Km values to L-alpha-alaninamide are about 26 mM(s).

L-alpha-alaninamide hydrolyzing activity is 0 to 1.5% of D-alpha-alaninamide hydrolyzing activity.

- 2) Optimal pH : it has [pH seven to 8] optimal pH at 30 **

- 3) Optimum temperature : it has optimum temperature at 40-45 ** by pH7.5.

- 4) Thermal stability : it will be deactivated if it is neglected for 10 minutes at the temperature of not less than 60 **.

- 5) pH stability : in 30 **, it is stable at pH 6.5-10.

- 6) Molecular weight : 50,000**5,000 (based on an SDS-polyacrylamide electrophoresis method)

- 7) Activation : don't need a coenzyme for activation.

- 8) Isoelectric point : as a microorganism used by pH5.2**0.3 this invention, it belongs to the

Arthrobacter group, as long as it is a microorganism which has the capability to produce the enzyme which has the above-mentioned character, any may be sufficient, but Arthrobacter Espy (Arthrobacter sp.) H-4904 can be illustrated, for example.

Arthrobacter Espy H-4904 is the microorganism newly separated from the nature.

Arthrobacter Espy's H-4904 mycology character is described below.

- (a) The form and size of gestalt 1 cell. The gestalt of being spherical (0.8-1.0 micrometer in diameter) and a rod (0.8 micrometer in diameter and 1.2-1.5 micrometers in length) is taken.

- 2) Motility : it has the Ben hair very much and there is motility.

- 3) Spore : don't form.

- 4) Gram's stain nature : -- positive 5 acid-fast : -- it hardly accepts.

- (b) Growth state 1 bouillon agar plate culture in each culture medium : form the colony where circular and a convex round form are smooth. It is **** about opaque white yellow. Anti-**** coloring matter is not generated.

- 2) Bouillon agar slant culture : fully grow and it is **** about opaque white yellow.

- 3) Bouillon liquid culture : grow in the shape of turbidity and don't form a film in the surface.

- 4) Bouillon gelatin stab culture : don't liquefy.

- 5) Litmus milk litmus is not returned and coagulation is not seen, either.

- (c) use physiological property 1 nitrate's reduction: -- positive 2 denitrification reaction: -- positive 3MR test: -- negative 4VP-test: -- generation [of negative 5 Indore]: -- generation [of negative 6 hydrogen sulfide]: -- hydrolysis [of negative 7 starch]: -- use [of negative 8 citrate] (Simmonds's culture medium): -- the source of positive 9 inorganic nitrogen. nitrate: -- negativity ammonium salt: -- generation [of weakly positive 10 coloring matter]: -- negative 11 urease: -- negative 12 oxidase:

— negative 13 catalase: — range 1 pHpH 5.0–9.0 (optima 6.0–8.0) of positive 14 growth
 2) Temperature : 15–37 °C (30 °C of optima)
 15) The attitude: aerotrophic thru/ or common gender anaerobic 16 OF test to oxygen : generation of acid from negative 17 sugars, and gas: Acid Gas (peptone water)
 L-arabinose — D-xylose . — D-glucose — D-mannose . — D-fructose — D-galactose . — Maltose — sucrose — Milk sugar — Trehalose — D-sorbitol — D-mannitol — inositol — Glycerin — Starch — 18 sodium-chloride tolerance: Grow by NaCl 15%.
 (d) Chemical presentation 1 peptidoglycan constituent: amino acid : lysine, an alanine, and glutamic-acid 2 mol%G+C(Tm):93.17 about the bacillus which has the above mycology character. It compares with the statement of Bar Jay's manual (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) vol.2 (1986). A spherical or rod-like gestalt is taken by a Gram positive, it has the Ben hair very much, and there is motility. Are aerotrophic thru/ or a common gender anaerobiosis, and do not form a spore, but it has lysine, an alanine, and glutamic acid as peptidoglycan constituent amino acid. As a result of searching based on mol%G+C of DNA being 63.17, the bacteria stock was identified the bacteria belonging to the *Arthrobacter* (*Arthrobacter*) group, and named the bacteria stock *Arthrobacter* Espy (*Arthrobacter* sp.) H-4904.

The bacteria stock is deposited with the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as FERM BP-1649 on January 14 in Showa 63.

As long as the culture medium which cultivates these microorganisms is a culture medium which can cultivate efficiently the microorganism which has the capability for a microorganism to contain a carbon source, a nitrogen source, mineral, etc. which can carry out utilization, and to generate the enzyme of this invention, any of a natural medium and a synthetic medium may be sufficient as it. As a carbon source, each microorganism can carry out utilization and alcohols, such as organic acid, such as carbohydrates, such as molasses which should just contain glucose, a shook sirloin, and these, and starch hydrolysate, acetic acid, and propionic acid, and ethanol, and propanol, are used. As a nitrogen source, the ammonium salt of various inorganic acid, such as ammonia, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium sulfate, and ammonium phosphate, or organic acid, amines, other nitrogen-containing compounds and peptone, a meat extract, a yeast extract, corn steep liquor, casein hydrolysate, soybean cake hydrolysate, various zymogen objects, the digest of those, etc. are used.

As an inorganic substance, potassium primary phosphate, potassium secondary phosphate, magnesium phosphate, magnesium sulfate, sodium chloride, ferrous sulfate, manganese sulfate, copper sulfate, calcium carbonate, etc. are used.

Culture is performed on condition of [aerobic] shaking culture or depths ventilation stirring culture. 15–37 °C of culture temperature is good, and culture time is usually 16 to 72 hours.

pH is held to 5.0–9.0 during culture. Adjustment of pH is performed using inorganic or organic acid, an alkali solution, urea, calcium carbonate, ammonia, etc.

Although it is necessary to add D-alpha-alaninamide, L-alpha-alaninamide, or DL-alpha-alaninamide to 20g / [0.1g / ** -] ** culture medium, and to carry out derivation accumulation of the D-amidase into a biomass in the case of culture, D-amidase can be stored up without adding D-alpha-alaninamide, L-alpha-alaninamide, or DL-alpha-alaninamide (henceforth an inductor) to a culture medium by using a suitable variant.

Such a variant can be obtained by using *Arthrobacter* Espy H-4904 as an old stock by the usual variation derivation method, for example, UV irradiation, X-ray irradiation, radiation irradiation, variation induction agent processing, etc.

The target variant can be obtained by acquiring the colony produced, the usual nutrient medium, for example, bouillon yeast extract medium, after mutation treatment, and choosing the strain which accumulates D-amidase in the culture medium which does not add an inductor.

Thus, *Arthrobacter* Espy H-7095 is raised as an example of the acquired variant. *Arthrobacter* Espy H-7095 is deposited with the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as FERM BP-1773 on March 2 in Showa 63.

What is necessary is just to use isolation of usual oxygen, and a purification method, in order to isolate and to refine an enzyme from culture medium. Centrifuge, carry out the harvest of the culture medium and for example, ultrasonic crushing, an French press, by the mechanical disruption by Menton Gow Lynne, dynomill, etc., after crushing a biomass. The crushing liquid obtained can be

centrifuged, ion exchange chromatography, such as curing salting by ammonium sulfate of the supernatant liquid, etc., DEAE-sepharose, and CM-sepharose, etc. can be performed, and an enzyme single in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis can be obtained.

The measuring method of enzyme activity is as follows.

After warming 1.0 ml of 50mM phosphate buffer solutions (pH 7.5) containing 250 mM D-alpha-alaninamide for 5 minutes at 30 °C, 0.1 ml of enzyme solutions are added and are made to react for 30 minutes 30 °C. 0.1 ml of 6N chloride is added, a reaction is stopped, and the generated amount of D-alpha-aminopropionic acid is measured with high performance chromatography (HPLC) under a following condition.

column: — CHIRALPAK WE(-) Daicel Chemical Industries, Ltd. make eluate: — 0.25mM CuSO₄

solution Style **: — a part for 1-ml/ column temperature: — 45 °C detection system: — o-phthalaldehyde — in addition, it is made to react at 50 °C and fluorescence is detected (excited

wavelengths: 344 nm, fluorescence wavelength: 444nm). Enzyme activity displays the activity which makes D-alpha-aminopropionic acid of 1micromol

generate in the bottom of the above-mentioned measuring condition, and 1 minute as one unit (U). The activity (henceforth L-amidase activity) which hydrolyzes L-alpha-alaninamide and generates L-alpha-aminopropionic acid can be measured by using L-alpha-alaninamide instead of D-alpha-

alaninamide under the above-mentioned measuring condition.

Although D-alpha-aminopropionic acid and/or L-alpha-alaninamide can be made to generate by making the enzyme of this invention act on DL-alpha-alaninamide or D-alpha-alaninamide, Under existence of the culture of the microorganism which has the capability to produce the enzyme of this

invention, a biomass, or a biomass treatment object, An enzymatic hydrolysis reaction is made to perform in the aqosity medium containing DL-alpha-alaninamide or D-alpha-alaninamide, and it is more preferred than a reaction mixture to extract D-alpha-aminopropionic acid and/or L-alpha-alaninamide.

During culture of a microorganism may be available for a reaction, and it may make a culture, a

biomass, a biomass treatment object or refining enzymes, DL-alpha-alaninamide, or D-alpha-alaninamide react in an aqosity medium after culture.

As a biomass treatment object of the microorganism which has D-amidase activity, the fixed thing of the dry matter of a biomass, a freeze-drying thing, a surfactant treatment thing, an enzyme treatment thing, a sonicate, a mechanical grinding treatment thing, a solvent treatment thing, the protein fractionation of a biomass, a biomass, and a biomass treatment object, etc. are raised.

Although refined D-amidase may be used as it is, it can also use as a fixed thing.

As an aqosity medium, amide, such as ketone, such as ester species, such as alcohols, such as buffer solution, such as water, an phosphate, carbonate, acetate, borate salt, citrate, and tris, methanol, ethanol, and propanol, and ethyl acetate, and acetone, and an acetamide, is raised.

When using the enzyme refined for the reaction, in order to raise stabilization of an enzyme, it is preferred to add 5 to 50% of glycerol to this aqosity medium.

A reaction is usually performed at the temperature of 15 °C – 50 °C pH 6.0–9.5 for 1 to 48 hours.

Although what is necessary is for the quantity and reaction time of the DL-alpha-alaninamide to be used or D-alpha-alaninamide just to determine the amount of enzymes in reaction mixture suitably, they are usually a 1–300K unit / **. When using a biomass especially for a reaction, they are usually 1g / **–50g / ** in a wet fungus body any of a separated type, a hydrochloride, and sulfate may be sufficient as the DL-alpha-alaninamide and D-alpha-alaninamide which are used for a reaction — the case of DL-alpha-alaninamide — 1–500g / ** — 1–400g / ** is used preferably, the case of D-alpha-alaninamide — 1–300g / ** — 1–200g / ** is used preferably.

The alanine racemase generally contained in a microbial cell is an enzyme which carries out the catalyst of the racemization of an optical activity alanine.

The optical purity of D-alpha-aminopropionic acid generated at the above-mentioned reaction is reduced.

Even if the microorganism used by this invention has low alanine-racemase content and it uses the microorganism concerned as it is, can obtain D-alpha-aminopropionic acid of sufficient optical purity, but. The publicly known method of controlling alanine-racemase activity, for example, the variant which do not have alanine-racemase activity by the usual mutation treatment or to which activity fell, is acquired, and it uses for a reaction. [Jay Wilde (J. Wilde); molecular and general FT genetics

(Mol.Gen.Genet.) 198,315-332 (1985)] Alanine-racemase activity is deactivated by heat treatment etc. [The Takamatsu, Tosa, and Senhata: Chemical Society of Japan 9-1369 (1983)] Or reaction time addition of the alanine-racemase inhibitor is carried out. [Chemicals and the living thing 20,770-772 (1986): biochemistry experiment lecture 11,275-296] By using which method suitably, D-alpha-aminopropionic acid whose optical purity is still higher can be obtained.

Since D-alpha-aminopropionic acid carries out generation accumulation into an aqueous medium and L-alpha-alaninamide remains in reaction mixture after a reaction when using DL-alpha-alaninamide for a reaction, L-alpha-alaninamide can be manufactured by extracting this from the inside of this aqueous medium.

The usual separation methods, such as column chromatography or the crystallizing method using ion-exchange resin etc. as a method of collecting D-alpha-aminopropionic acid and L-alpha-alaninamide out of culture medium or an aqueous medium, are used. Hereafter, an example explains this invention.

Example 1. BYG culture medium 150 ml of [culture media adjusted the pH to 7.2 by 6N NaOH powder bouillon (made in the Far East) 2% including glucose 0.2% 0.5% of yeast extract (made by Difco) and poly peptone 0.5%] were poured distributively in each flask with a baffle of 2**, and were sterilized for 20 minutes 120 **. 1 platinum-loop inoculation of the Arthrobacter Espy H-4904 grown to a bouillon slant was carried out to this culture medium, shaking culture was carried out for 20 hours, and 30 ** was used as seed culture liquid.

On the other hand, Glucose 3% and corn-steep-liquor 2% and peptone 0.5% and NaCl 1%, (NH₄)₂SO₄ 2%, MgSO₄ and 7H₂O 0.3%, FeSO₄ and 7H₂O 0.001%, MnSO₄ and 7H₂O 0.0001%, pH 7.2 culture medium containing DL-alpha-alaninamide 0.6% was prepared, 18** distributive pouring of was done at the jar fermenter of 30** capacity, and 120 ** was sterilized for 20 minutes. Seed culture liquid 2** was abacterially inoculated into this culture medium, and it cultivated to it for 30 hours in a part for 30 **, 450 rpm, and quantity-of-airflow 10**/. D-amidase activity of the obtained culture medium was 64 units/ml.

After the biomass which could centrifuge culture medium was suspended to 50mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.5) 1.9**, dynamill (DYNO-MILL; a laboratory mill KDL type, the product made by W.A.Bachafen Maschinenfabrik) performed biomass crushing. The DEAE-sepharose first flow (Pharmacia manufacture) column chromatography equilibrated with 50mM tris-chloride buffer solution (pH 7.5) is presented with the supernatant liquid produced by centrifuging biomass crushing liquid. Concentration gradient elution was performed using the buffer solution containing 0 - 0.4M sodium chloride. The 0.2M sodium chloride eluate fraction was eluted in D-amidase. The butyl-Toyopearl (made by TSK-GEL 650C Oriental soda company) column chromatography equilibrated with 50mM tris-chloride buffer solution (pH 7.5) which contains ammonium sulfate of saturated concentration 20 more% is presented with an activity fraction. Concentration gradient elution was performed using the buffer solution which contains saturated ammonium sulfate 20% - 0.1%.

The saturated-ammonium-sulfate eluate fraction was eluted in D-amidase 15% - 10%. It adds so that it may become after demineralization about an activity fraction and may become 25% (v/v) about glycerol in UF membrane (SIP-1013, Asahi Chemical Co., Ltd. make). The DEAE-TrisacrylLS (made by R**actifs IBF Soc.Chim) column chromatography equilibrated with 50mM tris-chloride buffer solution (pH 7.5) containing glycerol 25% (v/v) is presented. Concentration gradient elution was performed using the buffer solution containing the sodium chloride of 0-0.4M. The fraction in which D-amidase contains 0.2M sodium chloride was eluted.

D-amidase activity of the obtained enzyme is a 6.0x10⁴ unit, and showed the single band of the molecular weight 50,000 [about.] by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The specific activity and Km value to the D-alpha-alaninamide and L-alpha-alaninamide of this enzyme were shown in the 1st table.

表 1

比活性(単位/㎎蛋白質)	D-α-アラニン	
	ニニアミド	ニアミド
1800	17.4	
4.2		28.1

The relative activity which set pH 7.5 enzyme activity to 100 showed the activity at the time of changing pH to Drawing 1. As shown in Drawing 1, this enzyme had [pH seven to 8] optimal pH at 30 **. The relative activity which set enzyme activity in 37 ** to 100 showed the activity at the time of changing temperature to Drawing 2. As shown in Drawing 2, this enzyme had optimum temperature at 40-45 ** by pH 7.5.

The pH stability of this enzyme was measured by the following methods.

In addition to 0.95 ml of various buffer solution of pH 6-10 which contains glycerol 25%, 0.05 ml of 50mM tris-chloride buffer solution (pH 7.5) containing 19.2 units of this enzyme was neglected at 30 ** for 2 hours. It is a 0.5-ml D-alpha-alaninamide solution after settlement and about 0.05 ml of this enzyme solution. In addition to [50mM phosphate buffer solution (pH 7.5) containing D-alpha-alaninamide 12.5g/**, and glycerol 25% (v/v)], the reaction was performed for 30 minutes at 37 **. After adding 0.1 ml of 6N chloride and stopping a reaction after a reaction, under [a fixed quantity / amount / of D-alpha-aminopropionic acid / which was generated]. Enzyme activity displayed the enzyme activity before 30 ** and 2-hour settlement in the relative activity set to 100. The result was shown in Drawing 3. As shown in Drawing 3, this enzyme was stable in pH 6.5 to ten.

The temperature stability of this enzyme was measured by the following methods.

0.5 ml of 50mM tris-chloride buffer solution (pH 7.5) containing 192 units of this enzyme was diluted with 50mM phosphate buffer solution (pH 7.5) which contains a glycerol 25% (v/v) 10 times. It ice-cooled, immediately after taking 0.5 ml of this diluted solution and settling for 10 minutes at various kinds of temperature. It is a 0.5-ml D-alpha-alaninamide solution after settlement and about 0.05 ml of this enzyme solution. In addition to [50mM phosphate buffer solution (pH 7.5) containing D-alpha-alaninamide 12.5g/**, and glycerol 25% (v/v)], the reaction was performed for 30 minutes at 37 **. After adding 0.1 ml of 6N chloride and stopping a reaction after a reaction, under [a fixed quantity / amount / of D-alpha-aminopropionic acid / which was generated]. Enzyme activity displayed the enzyme activity before neglecting it for 10 minutes at each temperature in the relative activity set to 100. The result was shown in Drawing 4. As shown in Drawing 4, when this enzyme was neglected for 10 minutes at the temperature of not less than 60 **, it was deactivated.

Example 2. 150 ml of BYG culture media of the same presentation as Example 1 were poured distributively in each flask with a baffle of 2**, and were sterilized for 20 minutes 120 **. 1 platinum-loop inoculation of the Arthrobacter Espy H-4904 grown to a bouillon slant was carried out, shaking culture was carried out to this culture medium for 20 hours, and 30 ** was used for it as seed culture liquid.

On the other hand, Glucose 3% and corn-steep-liquor 2% and peptone 0.5% and NaCl 1%, (NH₄)₂SO₄ 2%, MgSO₄ and 7H₂O 0.3%, and FeSO₄ and 7H₂O 0.0001%, pH 7.2 culture medium containing MnSO₄ and 7H₂O 0.0001%, and DL-alpha-alaninamide 0.6% was prepared, 1.5** distributive pouring of was done at the jar fermenter of 3** capacity, and 120 ** was sterilized for 20 minutes. 150 ml of seed culture liquid was abacterially inoculated into this culture medium, and it cultivated in 30 **, 800 rpm, and quantity-of-airflow 1vum to it for 24 hours. 5000 rpm of obtained culture medium was centrifuged for 10 minutes at 4 **. The solution which dissolved 420 g (592g as a hydrochloride) of DL-alpha-alaninamide, NaH₂PO₄ and 2H₂ O15.6g, and Na₂HPO₄ and 12H₂ 35.8g in deionized water was added to the obtained wet fungus body 10g, and it was considered as 2** in the whole quantity. After adjusting the pH to 6.7 in 10N NaOH, 38 ** and a 10-hour reaction were performed agitating reaction mixed liquor gently. During the reaction, it maintained to pH 6.7 in 6NHCl.

Under [a fixed quantity / amount / of L-alpha-alaninamide / the amount of D-alpha-aminopropionic acid after ending reaction and in reaction mixed liquor, and]. The result was shown in the 2nd table.

表 2

力価 (g/ℓ)	反応収率 (%)		光学純度 (%)
	105	99	99.3
D-α-アラニン			
L-α-アラニン	105	-	99.0

After adjusting this reaction mixed liquor to 1** picking and adjusting pH to 4.5, it applied to ion-

exchange resin diagram ion SK1B(NH₄⁺ type) (made by Mitsubishi Kasei Corp.)3**, and D-alpha-aminopropionic acid and L-alpha-alaninamide were separated. As a result of carrying out vacuum concentration of the fraction containing D-alpha-aminopropionic acid and each L-alpha-alaninamide and depositing a crystal, 85 g (not less than 99.5% of optical purity) of D-alpha-aminopropionic acid and 75 g (not less than 99.5% of optical purity) of L-alpha-alaninamide were obtained. Instead of example 3, DL-alpha-alaninamide, it carried out like Example 2 except having used 210 g of D-alpha-alaninamide.

As a result, D-alpha-aminopropionic acid carried out 103g / ** (99.1% of optical purity) generation accumulation at the time of ending reaction.
Example 4. The variant was separated by using Arthrobacter Espy H-4904 as an old stock. It is NB culture medium about an old stock. It cultivated for 30 ** and one day by [the culture medium which contained 20g of powder bouillon (made in the Far East), and 5 g of yeast extracts (made by Difco) in water 1**, and adjusted them the pH to 7.2 by NaOH]. The harvest of the biomass was carried out, it added so that it might be suspended to the concentration of a 10⁸ cell / ml and might become [ml] 0.1N tris-maleic acid buffer solution (pH 6.0) in 400 microg /about N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) here, and it processed for 30 minutes at the room temperature. After the physiological saline washed the biomass enough, it applied to NB agar medium (culture medium which added the agar 20g to NB culture medium), and cultivated for one to six days at 30 **. The colony which appeared was *****(ed) one time to NB agar medium, and it cultivated for one to two days at 30 **.

Thus, 1 platinum-loop inoculation was carried out to the Erlenmeyer flask of the 250-ml capacity containing 40 ml of BYG culture media which sterilized 120 ** of acquired strains for 20 minutes, and shaking culture was carried out at 30 ** for 21 hours. 5000 rpm of obtained culture medium was centrifuged for 10 minutes, and the biomass was obtained. The obtained biomass was suspended to 50mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.5) containing a D-alpha-alaninamide hydrochloride so that it might become the concentration of 2g / ** as a wet fungus body. D-alpha-alaninamide hydrochloride concentration is final concentration, and it was adjusted so that it might become 25g / ** as D-alpha-alaninamide. The amount of D-alpha-aminopropionic acid generated with high performance chromatography after a 1-hour reaction according to the conditions of Example 1 at 38 ** was quantified, and D-amidase activity per wet fungus body was computed.
D-amidase activity was displayed with the number of unit of per wet fungus body 1g. Using Arthrobacter Espy H-4904 as contrast, except having done 2g / ** addition of DL-alpha-alaninamide into the culture medium, it carried out like the above and D-amidase activity was measured. Thus, Arthrobacter Espy H-7095 was acquired as the old stock which added and cultivated the inductor, and a variant which accumulates the D-amidase activity almost same at inductor nonsupplemented media.

A result is shown in the 3rd table.

第 3 表

菌株	D-α-アラニン アミド添加の有無	D-α-ミダラーゼ活性 単位/乾燥菌体
アースロバク ターモエスビ ャー-4904	有	688
アースロバク ターモエスビ ャー-7095	無	633

Example 5. It carried out like Example 2 except cultivating using Arthrobacter Espy H-7095, without adding DL-alpha-alaninamide to a culture medium.
A result is shown in the 4th table.

第 4 表

	力価 (g/L)	反応収 率(%)	光学純度 (%)
D-α-アラニン	104	99	99.2
L-α-アラニンアミド	105	-	99.0

It carried out like Example 5 except using 210 g of D-alpha-alaninamide instead of example 6. DL-alpha-alaninamide.

As a result, D-alpha-aminopropionic acid carried out 104g / ** (99.3% of optical purity) generation accumulation at the time of ending reaction.

Example 7. After washing and centrifuging the wet fungus body 90g produced by cultivating like Example 5 with a physiological saline using Arthrobacter Espy H-7095, it was suspended so that it might become distilled water with 150 ml in the whole quantity. The immobilized cell with a particle diameter of about 2 mm was obtained by dropping the mixed liquor obtained by adding the solution which dissolved 9 g of sodium alginate (made by Fuji Chemical Industry Co., Ltd.) in 300 ml of distilled water to this suspension at a calcium chloride solution 2%. As a result of reacting like Example 2 using 25g of immobilized cells / **, D-alpha-aminopropionic acid carried out 105g / ** (98.2% of optical purity) generation accumulation.

Example 8. It was suspended so that it might become 10mM phosphate buffer solution (pH 7.0) with 200 ml in the whole quantity using Arthrobacter Espy H-7095 about the wet fungus body 50g produced by cultivating like Example 5. 15000 rpm of this suspension was processed for 20 minutes under ice-cooling with the homogenizer (Nissay Excel auto homogenizer), and the biomass was crushed. 12000 rpm of obtained biomass crushing liquid was centrifuged for 20 minutes at 4 **, and supernatant liquid was obtained as a biomass extract. 100 ml of supernatant liquid [5 ** of] was contacted to HPA-75 (made by Mitsubishi Kasei Corp.) 20ml beforehand equilibrated with 10mM phosphate buffer solution (pH 7.0) for 24 hours. After having been suspended to the glutaraldehyde solution 0.5 more%, making this HPA-75 react for 120 minutes at 4 ** and making D-amidase and HPA-75 construct a bridge, 10mM phosphate buffer solution (pH 7.0) washed 3 times, and the fixed thing of D-amidase was obtained. The specific activity of this fixed thing was 550 units/ml. As a result of reacting like Example 2 using this 20 ml of fixed thing / **, D-alpha-aminopropionic acid carried out 104g / ** (99.2% of optical purity) generation accumulation.

EFFECT OF THE INVENTION New D-amidase is obtained by this invention and the L-alpha-alaninamide which is manufacturing raw materials of L-alpha-aminopropionic acid which is amino acid important as high D-alpha-aminopropionic acid, and/or foodstuffs and drugs of optical purity useful as the intermediate or synthetic powder for sweetners or various physiological active substance composition can be manufactured cheaply and efficiently.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

The pH dependency of this enzyme and Drawing 2 show the temperature dependence of this enzyme, Drawing 3 shows the pH stability of this enzyme, and, as for Drawing 1, Drawing 4 shows the temperature stability of this enzyme, respectively.

[Translation done.]